



(4)

PATENT  
Docket No. 251002009300

CERTIFICATE OF MAILING BY "FIRST CLASS MAIL"

I hereby certify that this correspondence is being deposited with the United States Postal Service as first class mail in an envelope addressed to:  
Assistant Commissioner for Patents, Washington, D.C. 20231, on March 18, 2002.

*Tami M. Procopio*  
Tami M. Procopio

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

In the application of:

Emi NUNOKAWA, et al.

Serial No.: 09/989,974

Filing Date: 20 November 2001

For: A MODULAR MASS TRANSFER AND  
PHASE SEPARATION SYSTEM

Examiner: To be assigned

Group Art Unit: 1653

SUBMISSION OF CERTIFIED FOREIGN PRIORITY DOCUMENTS

Assistant Commissioner for Patents  
Washington, D.C. 20231

Dear Sir:

The filing papers claimed priority under 35 U.S.C. § 119 on the basis of Japanese patent application no. 2001-065799, filed on 8 March 2001. Pursuant to 35 U.S.C. § 1.55, a certified copy of said Japanese patent application is submitted herewith, thereby perfecting the priority claim.

- ☒ The issue fee has not become due for this application.
- ☐ The issue fee is due to be paid on \*.
- ☐ The issue fee was paid on \* and a petition requesting entry of the priority documents accompanies this submission.

The Assistant Commissioner is hereby authorized to charge any additional fees under 37 C.F.R. §§ 1.16 and 1.17 that may be required by this submission, or to credit any overpayment, to Deposit Account No. 03-1952.

Dated: 18 March 2002

Respectfully submitted,

By: AJA LA Reg. No. 39,183  
Kate H. Murashige  
Registration No. 29,959

Morrison & Foerster LLP  
3811 Valley Centre Drive  
Suite 500  
San Diego, California 92130-2332  
Telephone: (858) 720-5112  
Facsimile: (858) 720-5125



日 本 国 特 許 庁  
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office

出 願 年 月 日

Date of Application:

2001年 3月 8日

出 願 番 号

Application Number:

特願2001-065799

出 願 人

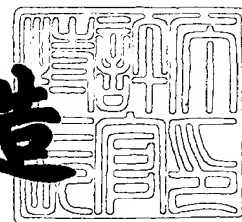
Applicant(s):

理化学研究所

2001年11月 2日

特 許 庁 長 官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

及 川 耕 造



出証番号 出証特2001-3096522

【書類名】 特許願

【提出日】 平成13年 3月 8日

【整理番号】 RJH12-120T

【特記事項】 特許法第30条第1項の規定の適用を受けようとする特許出願

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 C12P 21/00  
C07K 1/34

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県横浜市鶴見区末広町1-7-22 理化学研究所 横浜研究所内

【氏名】 布川 絵未

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県横浜市鶴見区末広町1-7-22 理化学研究所 横浜研究所内

【氏名】 木川 隆則

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県横浜市鶴見区末広町1-7-22 理化学研究所 横浜研究所内

【氏名】 矢吹 孝

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県横浜市鶴見区末広町1-7-22 理化学研究所 横浜研究所内

【氏名】 横山 茂之

【特許出願人】

【識別番号】 000006792

【氏名又は名称】 理化学研究所

【代理人】

【識別番号】 100080816

【弁理士】

【氏名又は名称】 加藤 朝道

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 030362

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 無細胞タンパク質合成系によるタンパク質の製造方法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

細胞抽出液と、タンパク質をコードする核酸と、タンパク質合成基質としてのアミノ酸とを含む無細胞タンパク質合成系による X 線結晶解析に適したタンパク質の製造方法において、

前記アミノ酸の少なくとも 1 種が重原子を含むアミノ酸であり、

生成するタンパク質への前記重原子を含むアミノ酸の導入率が少なくとも 8 0 %であることを特徴とする無細胞タンパク質合成系によるタンパク質の製造方法

。

【請求項 2】

前記無細胞タンパク質合成系が、透析膜を介して透析内液と透析外液とから構成され、前記細胞抽出液と、前記タンパク質をコードする核酸とを透析内液に含み、前記タンパク質合成基質としてのアミノ酸を透析内液及び／又は透析外液に含む請求項 1 記載の方法。

【請求項 3】

前記細胞抽出液が大腸菌、好熱性細菌又は酵母の細胞抽出液である請求項 1 又は 2 記載の方法。

【請求項 4】

前記大腸菌細胞抽出液が、大腸菌 S 3 0 細胞抽出液を濃縮したものである請求項 3 記載の方法。

【請求項 5】

前記透析外液が更に、A T P 再生系、高分子吸収剤及び還元剤を含み、タンパク質合成反応速度が低下した時点で新鮮なものと交換されることを含む請求項 2 ～ 4 何れか記載の方法。

【請求項 6】

前記透析膜が、分画分子量 10,000 ～ 100,000 の透析膜である請求項 2 ～ 5 何れか記載の方法。

【請求項 7】

前記無細胞タンパク質合成系が、ATP再生系としてクレアチンキナーゼと、クレアチンホスフェートの組合せを含む請求項 1 ～ 6 何れか記載の方法。

【請求項 8】

前記重原子が水銀、白金、ヨウ素、鉄及びセレンの何れかである請求項 1 ～ 7 何れか記載の方法。

【請求項 9】

前記重原子を含むアミノ酸が、セレノメチオニン又はセレノシステインである請求項 1 ～ 6 何れか記載の方法。

【請求項 1 0】

前記重原子を含むアミノ酸の導入率が、少なくとも 9 5 % である請求項 1 ～ 8 何れか記載の方法。

【請求項 1 1】

請求項 1 ～ 8 何れか記載の方法により製造され、前記重原子を含むアミノ酸の導入率が少なくとも 9 5 % であるタンパク質。

【発明の詳細な説明】

【0 0 0 1】

【発明の属する技術分野】

本発明は、細胞抽出液を含む無細胞タンパク質合成系によるタンパク質の合成方法に関するものであり、特にタンパク質の X 線結晶解析用の試料として用いるのに好適なタンパク質の合成方法に関するものである。

【0 0 0 2】

【従来の技術】

近年、各種生物の DNA の塩基配列が急速に明らかにされ、これら大量のゲノム配列情報から抽出される膨大な数の遺伝子について、それぞれコードされたタンパク質の立体構造を体系的に解明し、構造と機能の関係を明確にしようとする「構造ゲノム科学」が重要な研究として注目されている。

【0 0 0 3】

この構造ゲノム科学研究において、構造解析の対称となるタンパク質は、ヒト

の場合であれば3万～4万以上種類があり極めて多い。このため、ターゲットとなるタンパク質の選択を効率良く行うことが必要であると共に、選ばれたターゲットを実際に発現及び調製し、構造解析に必要な試料をミリグラムオーダーで大量に得ることが要求される。

## 【0004】

従来、このような試料を調製する方法としては、クローン化したDNAを大腸菌等の生細胞に導入する遺伝子工学的な手法が広く利用されている。しかしながら、この方法では生産可能な外来性タンパク質は、宿主の生命維持機構をくぐり抜けられる分子種に限られている。また、化学合成技術の進歩により数十個のアミノ酸からなるペプチドの自動合成も可能になっているが、より分子量の大きいタンパク質を得ることは合成収率、副反応等の限界から極めて困難である。

## 【0005】

タンパク質の立体構造解析を行う方法としては、従来よりX線結晶解析による方法が用いられてる。近年シンクロトロンビームの使用により、他のX線発生装置に比べてより強力なX線が得られることに加えて、任意の波長が選択できるようになり、たった1種類の重原子がタンパク質中にあるだけで、多波長異常分散 (multiwavelength anomalous diffraction; MAD) 法 (Hendrickson, W.A., Science, 254, 51-58, 1991参照) により立体構造を解くことができ、立体構造解析決定にかかる時間の短縮化を図ることができるようになった。

## 【0006】

このX線結晶解析によるタンパク質の立体構造決定を行うに際し、タンパク質の重原子同型置換体の調製が位相決定のために必須であり、多くの場合上記重原子同型置換体としてセレノメチオニンを含むタンパク質が使用されている。メチオニンの代わりにセレノメチオニンを使って、メチオニン要求株で遺伝子を発現させることでタンパク質にセレンを取りこませることができる。

## 【0007】

しかしながら、生細胞を用いた発現系では、セレノメチオニンの強い細胞毒性のために、タンパク質の発現量が非常に低く、また満足なセレノメチオニンの置換率を得ることができないという問題点があった。



## 【 0 0 0 8 】

このような問題に対し、生命科学と化学的手法を融合し、生物体の優れた特性を最大限に利用しようとするタンパク質の合成方法として、細胞抽出液を用いて試験管内でタンパク質を合成する無細胞タンパク質合成システムの開発が進められている（例えば、Science 1988, 242, p1162-1164、特開平4-200390号公報等参照）。この無細胞タンパク質合成システムは、生体の遺伝情報の翻訳系を人工容器内に取り揃え、設計した核酸を鋳型として非天然型をも含む望みのアミノ酸を取りこむことのできる合成系を再構築するというものである。

## 【 0 0 0 9 】

この無細胞タンパク質合成系は、煩雑で多段階の操作が必要であることや、従来は著しく生産性が低かったためその応用が限られていたが、例えば本発明者等により改良された透析法を用いる合成系（特開2000-175695号公報参照）では高効率化が図られ、実用的なレベルにまで技術が向上してきた。

## 【 0 0 1 0 】

しかしながら、重原子同型置換体を合成する場合には、タンパク質合成基質の調製やその最適条件の設定が複雑且つ困難であるため、無細胞タンパク質合成系で製造されたタンパク質を用いてMAD法によるX線結晶解析を行った報告はなく、そのタンパク質への重原子の導入効率も未だ不十分であった。

## 【 0 0 1 1 】

## 【発明が解決しようとする課題】

したがって、本発明はタンパク質のX線結晶構造解析、特にMAD法による位相決定に適した重原子置換体タンパク質の迅速且つ簡便な合成方法を提供することを課題とする。

## 【 0 0 1 2 】

## 【課題を解決するための手段】

上記課題を解決するために、本発明者等はX線結晶構造解析用のタンパク質へ重原子を導入するための方法について鋭意研究を行なった結果、細胞抽出液を用いた無細胞タンパク質合成系において、種々の条件の最適化を行うことによって、極めて高い導入率で重原子が導入された高濃度のタンパク質を合成できること

を見出し、しかもこのタンパク質の結晶を作成してX線結晶解析を行ったところ極めて迅速且つ精度良くタンパク質の立体構造を決定できることを見出し、これらの知見に基づいて本発明を完成するに至った。

【 0 0 1 3 】

すなわち、本発明は、細胞抽出液と、タンパク質をコードする核酸と、タンパク質合成基質としてのアミノ酸とを含む無細胞タンパク質合成系によるX線結晶解析に適したタンパク質の製造方法において、

前記アミノ酸の少なくとも1種が重原子を含むアミノ酸であり、

生成するタンパク質への前記重原子を含むアミノ酸の導入率が少なくとも80%であることに特徴を有する無細胞タンパク質合成系によるタンパク質の製造方法である。

【 0 0 1 4 】

本発明の好ましい態様において、上記無細胞タンパク質合成系は、透析膜を介して透析内液と透析外液とから構成され、上記細胞抽出液と、上記タンパク質をコードする核酸とを透析内液に含み、タンパク質合成基質としてのアミノ酸を透析内液及び／又は透析外液に含む。上記細胞抽出液は好ましくは大腸菌、好熱性細菌又は酵母の細胞抽出液であり、上記大腸菌細胞抽出液は、大腸菌 S 3 0 細胞抽出液を濃縮したものが更に好ましい。

【 0 0 1 5 】

本発明の更に好ましい態様において、上記透析外液は更に、ATP再生系、高分子吸収剤及び還元剤を含み、タンパク質合成反応速度が低下した時点で新鮮なものと交換することができる。また、上記透析膜は、分画分子量10,000～100,000の透析膜が好ましい。ATP再生系としてクレアチンキナーゼと、クレアチンホスフェートの組合せが含まれる。

【 0 0 1 6 】

本発明の方法により導入される重原子には、水銀、白金、ヨウ素、鉄又はセレンが含まれる。また、このような重原子を含むアミノ酸として、セレノメチオニン又はセレノシステイン等のアミノ酸を好適に用いることができる。

【 0 0 1 7 】

異なる視点において、本発明は、上記の方法により合成されたタンパク質中の上記重原子を含むアミノ酸の導入率が、少なくとも95%であるタンパク質である。

## 【0018】

## 【発明の実施の形態】

本発明において、上記無細胞タンパク質合成系とは、細胞抽出液を用いて試験管内でタンパク質を合成する系であり、このような合成系としてはmRNAの情報を読み取ってリボソーム上でタンパク質を合成する無細胞翻訳系、又はDNAを鋳型としてRNAを合成する無細胞転写系と無細胞翻訳系の両者を含む系の何れでも良い。

## 【0019】

上記細胞抽出液としては、リボソーム、tRNA等のタンパク質合成に必要な成分を含む真核細胞又は原核細胞の抽出液が使用可能である。前記真核細胞及び原核細胞としては従来公知のものが何れも使用可能であり、具体的に例示すれば、大腸菌、好熱性細菌、小麦胚芽、ウサギ網状赤血球、マウスL-細胞、エールリッヒ腹水癌細胞、HeLa細胞、CHO細胞及び出芽酵母などが挙げられ、特に大腸菌由来のもの（例えば大腸菌S30細胞抽出液）又は高度好熱菌(*Thermus thermophilus*)由来のものが高い合成量を得る点において望ましい。該大腸菌S30細胞抽出液は、大腸菌A19 (rna, met), BL21, BL21 star, BL21 codon plus株等から公知の方法 (Pratt, J.M. et al., Transcription and translation - a practical approach, (1984), pp.179-209, Henes, B.D.とHiggins, S.J.編、IRL Press, Oxford参照) に従って調製できるし、あるいはPromega社やNovagen社から市販されるものを使用してもよい。

## 【0020】

かかる細胞抽出液は、上記各細胞抽出液が濃縮されたもの（以下「濃縮細胞抽出液」という。）でもよいし、未濃縮のもの（以下「粗細胞抽出液」という。）であっても良いが、濃縮細胞抽出液を使用することにより、より高いタンパク質合成量が得られる。この濃縮細胞抽出液を得る方法としては、任意の手段例えば限外濾過、透析、PEG沈殿等によって行うことができる。濃縮の度合いは、通

常1.5倍以上、好ましくは2倍以上である。大腸菌由来の細胞抽出液の場合、限外濾過遠心で1.5～7倍以上、PEG沈殿で1.5～5倍以上まで濃縮可能であるが、4倍を超えるとハンドリングが難しくなる。また、小麦胚芽抽出液の場合、PEG沈殿で10倍の濃縮が可能である(Nakano, H. et al., 上掲参照)。PEG沈殿による方法では、細胞抽出液にPEG溶液を混ぜることによりタンパク質、核酸を沈殿させて回収し、これを少量の緩衝液に溶かすことにより濃縮細胞抽出液を得ることができる。透析による濃縮は、例えば、振とう又は攪拌可能な閉鎖系で細胞抽出液を透析内液とし、透析膜（例えば分子量限界1000～14,000）を介して透析外液に対して透析を行うことによって得ることができる。ここで透析外液は、酢酸カリウム、酢酸マグネシウム、ジチオスレイトールを含有する緩衝液と、PEG（例えば#8000）、ショ糖／エピクロルヒドリン水溶性合成共重合体（例えばSIGMA社製のFicoll）等の高分子吸収剤とを含むことができる。高分子吸収剤は透析内液の水分を透析膜を介して透析外液中に吸収するために必須である。

#### 【0021】

本発明の方法では、透析法が好適に使用可能であるが、これ以外にも例えばバッチ法、フロー法等でも良い。上記透析法とは、上記細胞抽出液を含有するタンパク質合成系を透析内液とし、該透析内液が物質移動を可能とする透析膜を介して透析外液に含まれるタンパク質合成基質に対して透析を行う方法であり、生産されたタンパク質を上記透析内液又は透析外液から回収することができる。

#### 【0022】

上記透析内液には、大腸菌S30等の濃縮細胞抽出液（10～90重量%）の他に、目的のタンパク質をコードするDNA又はRNA（mRNA等）、ATP（0.5～5mM）、GTP（0.05～0.5mM）、CTP（0.05～0.5mM）、UTP（0.05～0.5mM）、緩衝液、塩類、アミノ酸、RNase阻害剤、抗菌剤、必要によりRNAポリメラーゼ（DNAを鋳型とする場合）及びtRNA等を含むことができる。その他、ATP再生系、ポリエチレングリコール（例えばPEG#8000）、3',5'-cAMP、葉酸類（0.1～5mM）、還元剤（例えば1～10mMのジチオスレイトール）等を含むことができる。一方、透析外液は、上記透析内液組成から、細

胞抽出液、RNase阻害剤、DNA又はRNA及びRNAポリメラーゼを除いたものが使用できる。

## 【 0 0 2 3 】

緩衝液としては、例えばHepes-KOH、Tris-OAcのような緩衝剤を使用できる。塩類としては、酢酸塩(例えばアンモニウム塩、マグネシウム塩等)、グルタミン酸塩等が使用でき、抗菌剤としてはアジ化ナトリウム、アンピシリン等が使用可能である。またDNAを鋳型として用いる場合にはRNAポリメラーゼを反応系に添加するが、例えばT7RNAポリメラーゼ等の市販の酵素を使用できる。

## 【 0 0 2 4 】

本発明において、ATP再生系としては好ましくは $0.02 \sim 5 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ のクレアチンキナーゼ(CK)と $10 \sim 100\text{mM}$ のクレアチンホスフェート(CP)の組合せが挙げられるが、これに限定されるものではなく、従来より公知の材料が何れも使用可能であり、上記以外に例えば $1 \sim 20\text{mM}$ のホスホエノールピルベート(PEP)と $0.01 \sim 1 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ のピルビン酸キナーゼ(PK)の組合せ等が使用可能である。これらPK及びCKは何れもADPをATPに再生する酵素であり、それぞれPEPおよびCPを基質として必要とする。

## 【 0 0 2 5 】

本発明で製造されるタンパク質は、任意のものを対象とし、公知のもの又は新規のものを含む。目的のタンパク質をコードする核酸はDNAでもRNAでも良く、真核生物又は原核生物の細胞又は組織から公知の方法を用いて抽出することができる。cDNAライブラリー等から公知の方法によりクローン化したDNAでも良い。また、これらの抽出したDNAやcDNA若しくはゲノムライブラリーを鋳型としてPCR法により増幅したDNA断片をそのまま利用できるように、従来必要であった発現ベクターへのクローニングという煩雑な操作を経ることなく、多数のタンパク質を、同時並行的に、迅速に発現、調製することができる。

## 【 0 0 2 6 】

本発明の実施においては、透析膜の内部に上記透析内液を、その外部に透析外液を入れた。膜の分子量限界に応じて物質が膜を介して移動可能とする閉鎖系を振とう又は攪拌し、生成した目的タンパク質を透析内液又は外液から回収するこ

とができる。温度及び攪拌条件等の反応条件は、タンパク質の種類に応じて任意の条件を使用できる。例えば反応温度は通常25～50℃、好ましくは37℃であるが、高度好熱菌由来の菌体抽出液を用いる合成系では50℃を超える温度でも良い。

## 【 0 0 2 7 】

上記透析外液は、反応速度の低下が認められる時点で、新鮮なものと交換されることが望ましい。また、透析膜の分子量限界が10,000ダルトンを超えるもの、好ましくは約50,000ダルトン及びそれ以上のものを使用する場合は、タンパク質の生産量を更に高めることができる。

## 【 0 0 2 8 】

本発明においては、上記無細胞タンパク質合成系には、上記細胞抽出液とともに重原子を含むアミノ酸が添加される。アミノ酸はタンパク質を構成する20種類のアミノ酸であり、このうちの少なくとも1種が重原子を含んでいれば良い。該重原子としてはX線の異常散乱(anomalous scattering)を起こさせるものであれば何でも良いが、通常は水銀(Hg)、白金(Pt)、ヨウ素(I)、鉄(Fe)又はセレン(Se)等が用いられ、特にMAD法に適したタンパク質を製造する際には、水銀(Hg)、セレン(Se)、鉄(Fe)等が有効である。また、これらの重原子を含むアミノ酸はタンパク質を構成する20種類のアミノ酸又はその類似体であれば何でも良いが、取扱いや製造方法の容易さを考慮してセレノメチオニン又はセレノシステインを用いることが好ましい。これらセレンを含むアミノ酸は、分子中の硫黄(S)原子をセレン(Se)原子に置換することによって容易に製造することができる。

## 【 0 0 2 9 】

本発明の一実施形態としてセレノメチオニンを導入する場合には、通常アミノ酸として用いられるメチオニンをすべてセレノメチオニンで置換して、上記透析内液及び透析外液の何れか一方又は両方に添加することができる。添加量は、通常0.5～3.0 mMの濃度で、好ましくは0.8～1.5 mMの濃度である。

## 【 0 0 3 0 】

このような重原子を取り込んだタンパク質を用いて結晶化を行うことにより、もとの結晶(native crystal)と比べてタンパク質分子の配列には変化がなく、重原子が加わっているということだけが異なる結晶、すなわち重原子同型置換結晶

を調製することができる。重原子同型置換結晶はX線結晶解析において、位相決定に重要であり、特に異常散乱を利用して位相を決める場合には、複数の重原子同型置換結晶を調製することなく容易に位相を決定することができる。

#### 【0031】

本発明の方法により合成されたタンパク質中の重原子を含むアミノ酸の導入率は、用いるタンパク質及び重原子を含むアミノ酸の種類によって若干異なるが、通常は少なくとも80%、好ましくは90%以上、更に好ましくは95%以上の導入率を得ることができる。ここで、「導入率」とは、例えば、重原子を含むアミノ酸としてセレノメチオニンを用いた場合には、タンパク質分子中のメチオニン残基の中でセレノメチオニンによって置換された割合をいい、質量分析法及び／又はアミノ酸組成分析等の公知の方法により分析することができる。重原子同型置換結晶の単一性を図り、良好なX線回折データを取得するためには、重原子の導入率がほぼ100%であることが好ましい。

#### 【0032】

生成したタンパク質の精製は、生細胞からの分離と比べて混在する汚染物質の量及び種類が格段に少ないため、比較的容易に行うことができる。精製法はタンパク質の性質に応じて従来公知のものを単独に又は適宜組合せて使用できる。例えば、硫酸アンモニウム又はアセトン沈殿、酸抽出、アニオン又はカチオン交換クロマトグラフィー、疎水性相互作用クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィー、HPLC、電気泳動、クロマトフォーカシング等の慣用の技術を挙げることができる。生成タンパク質の同定及び定量は、活性測定、免疫学的測定、分光学的測定、アミノ酸分析等によって、必要に応じて標準サンプルと比較しながら行うことができる。

#### 【0033】

精製したタンパク質の結晶化は、該タンパク質溶液の溶解度を徐々に下げて飽和溶解度に達するような従来公知の方法により行うことができ、このような方法としては、透析法、蒸気拡散法、バッチ法、自由界面拡散法、濃縮法、温度勾配法等が挙げられる。例えば、蒸気拡散法は、気相を通じて拡散によって揮発性の溶媒や沈殿剤が移動するようなくみである。タンパク質溶液が沈殿剤溶液との

あいだで蒸気拡散することにより、タンパク質濃度と沈殿剤濃度が共に高まって過飽和の領域で結晶化が起こる。タンパク質溶液の液滴をどうつくるかによって、ハンギングドロップ法、シッティングドロップ法、サンドイッチドロップ法等の方法がある。

#### 【 0 0 3 4 】

結晶化に用いる沈殿剤としては、硫酸アンモニウム( $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ )、硫酸ナトリウム( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ )、塩化リチウム( $\text{LiCl}$ )、リン酸ナトリウム( $\text{Na}_2\text{PO}_4$ )等の塩や、メタノール、エタノール、ポリエチレングリコール等の有機化合物が用いられる。結晶化の条件は、沈殿剤の種類や濃度及び／又はタンパク質溶液の温度やpH等を種々検討して行う。

#### 【 0 0 3 5 】

X線結晶解析は、多波長以上分散(MAD)法を含み、これに用いられるX線は、シンクロトロン放射光から得られる0.3~3.0Åの波長である。MAD法は、入射X線エネルギー近傍の吸収端をもつ重原子同型置換結晶から、複数の波長によるX線回折データを得る方法である。X線と該重原子の電子殻との共鳴でX線の散乱に差を生じ、これによってタンパク質の構造解析での位相問題を解決することができる。この方法の原理はすでに古くから知られていたが、波長可変であるシンクロトロン放射光の出現によって始めてタンパク質の構造決定に使用されるようになり、Hendricksonらがこの方法によって初めてタンパク質の構造解析に成功した(Hendrickson W.A. et al., Proteins 4, 77-88, 1988及び、Hendrickson W.A. et al., EMBO J.5, 1665-1672, 1990参照)。

#### 【 0 0 3 6 】

シンクロトロン放射光とは、蓄積リングに打ち込まれた電子を磁場によって加速して得られる放射光であり、通常のX線発生装置よりも極めて強いエネルギーを有する。理研播磨研究所の第三世代大型放射光設備 Spring-8(8GeV)等が使用可能である。

#### 【 0 0 3 7 】

##### 【実施例】

以下に本発明の実施例として、発ガン遺伝子産物であるRasタンパク質を用い



て本発明の方法について検討した結果を詳細に説明する。Rasタンパク質はこれまでにその立体構造が明らかにされているタンパク質であるが、本発明はこの実施例に限定されるものではない。

## 【 0 0 3 8 】

[実施例 1] 大腸菌 S 3 0 抽出液を用いた無細胞タンパク質合成法によるセレノメチオニン導入Rasタンパク質の合成

大腸菌 S 3 0 抽出液は、Zubayら(Annu. Rev. Geneti. 7, 267-287, 1973)の方法に従って、大腸菌BL21 codon plus株から調製した。

## 【 0 0 3 9 】

タンパク質合成反応液(透析内液)は下記の表 1 に示した組成の溶液2.1mLに、Rasタンパク質の発現ベクターであるpK7-Ras (Kigawa et al., J. Biomol. NM R, 6,129-134, 1995)を13  $\mu$ g添加し、更に上記大腸菌 S 3 0 細胞抽出液を0.9mL添加してタンパク質の合成反応を行った。

## 【 0 0 4 0 】

【表 1】 タンパク質合成反応液(透析内液)の組成

組成	濃度
Hepes-KOH (pH7.5)	58 mM
DTT	1.8 mM
ATP	1.2 mM
GTP	0.87 mM
CTP	0.87 mM
UTP	0.87 mM
L-(-)-5--5, 6, 7, 8-テトラヒドロ葉酸	35 $\mu$ g/mL
サイクリックAMP(cAMP)	0.64 mM
酢酸アンモニウム	28 mM
グルタミン酸カリウム	200 mM
ポリエチレングリコール8000(PEG8000)	4.0% (w/v)
クレアチンフォスフェート	81 mM
酢酸マグネシウム	11 mM
メチオニンを除く19種類のアミノ酸	各1 mM
セレノメチオニン	1 mM
アジ化ナトリウム	0.05%
クレアチンキナーゼ	0.25 $\mu$ g/mL
T7RNAポリメラーゼ	0.27 mg/mL
RNアーゼ阻害剤 (Toyobo社製)	0.5 U/mL

タンパク質合成基質（透析外液）の組成は、上記表 1 の組成からクレアチンキナーゼ、T7RNAポリメラーゼ及びRNアーゼ阻害剤を除いたものを用いた。

## 【 0 0 4 1 】

セレノメチオニンの添加量は、上記Rasタンパク質の発現ベクターであるpK7-Rasの代わりにCAT遺伝子を含むpK7-CAT（CAT発現ベクター；Kim et al., Eur. J. Biochem. 239, 881-886, 1996参照）を用いた系でセレノメチオニン濃度を変化させて最適量を決定し、その結果を図 1 に示した。合成されたCATタンパク質の定量はShawらの方法(Methods Enzymol. 735-755, 1975参照)に従った。この結果より、CATタンパク質の合成量はセレノメチオニン標識の有無によってほとんど変わらず、約1.00 mM程度の添加量で十分なことが分かった。

## 【 0 0 4 2 】

3 mLの透析内液に対して30 mLの透析外液を使用し、37℃で6時間、Spectra/Por 7(Spectrum社製)を用いて透析を行なうことによってRasタンパク質合成を行った。合成反応終了後、陰イオン交換クロマトグラフィー(Source 15Q)及びゲル濾過クロマトグラフィー(Superdex 75)により精製し、SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)にてタンパク質純度の検定を行った。その結果、SDS-PAGEでほぼ単一のバンドが検出された。

## 【 0 0 4 3 】

また、セレノメチオニンの導入率を調べるために、精製されたタンパク質の質量分析をLC-MAS法を用いて行った。

## 【 0 0 4 4 】

図 2 には、上記方法により得られたセレノメチオニン導入Rasタンパク質とセレノメチオニンを含まないRasタンパク質との測定結果を示した。Rasタンパク質はN-末端がホルミル化されたものとホルミル化されていないものの2種類が存在し、それぞれ分子量の異なる2つのピーク（分子量、19,494.0及び19,522.0）が認められる（図 2（b）参照）。また、Rasタンパク質には4つのメチオニン残基が存在するため、導入されたセレノメチオニンの個数が一定でなければ分子量の異なる複数のピークが検出される可能性がある。しかしながら図 2（a）によれば、セレノメチオニン導入Rasタンパク質の測定結果においても上記ホルミル

化の有無による2つのピークしか検出されず、しかもこれらの分子量（分子量、19,662.0及び19,709.0）の増加は4つの硫黄原子がすべてセレン原子に置換されていること、即ち、4つのメチオニン残基のすべてがセレノメチオニンで置換されていることが示唆される。この結果から、質量分析法による測定誤差等を考慮しても、Rasタンパク質中のメチオニン残基のうち少なくとも95%以上がセレノメチオニンで置換されていること、即ち、セレノメチオニンの導入率は少なくとも95%以上であることが分かる。

## 【0045】

## [実施例2] セレノメチオニン導入Rasタンパク質の結晶化

上記実施例1の方法により精製したタンパク質を0.2 M 酢酸カルシウム、0.1 M カコジル酸ナトリウム(pH6.5)、及び18%PEG8000溶液に溶解し、ハンギングドロップ蒸気拡散法により、セレノメチオニン導入Rasタンパク質の結晶化を行った。上記タンパク質溶液を0.2 M 酢酸カルシウム、0.1 M カコジル酸ナトリウム(pH6.5)、及び18%PEG8000溶液の共存下、密封容器内でハンギングドロップ法により、20℃で2日間放置したところ図3に示したような結晶が生成した。

## 【0046】

## [実施例3] X線結晶解析によるRasタンパク質の立体構造解析

実施例2で調製した結晶を用い、理研播磨研究所の大型放射光施設Spring-8(8 GeV)のビームライン(BL44B2)によるX線結晶解析を行った。図4は、X線吸収微細構造(X-ray Absorption Fine Structure)測定によるRasタンパク質中のセレン原子の化学結合状態を示したものである。この結果から、セレン原子に特有の波長においてX線の吸収が認められ、MAD法により測定すべき波長を推定することが理解される。

## 【0047】

多波長異常分散(MAD)法によるデータの取得は、上記X線吸収微細構造のデータに基づいて、4種類の波長(0.979251Å, 0.978815Å, 0.971148Å及び0.986604Å)で行った。位相決定及び電子密度図の作成は、DENZO/SCALEPACK (Otwinowski, Z. and Minor, W., Macromol.Crystallogr., A276, 307-326, 1997参照)、SHARP (de la Fortelle, E., Irwin, J.J., and Bricogne, G. Crystallogr.

Comput., 7, 1-9, 1997参照)、Shake-and-Bake (Miller, R., DeTitta, G.T., Jones, R., Langs, D.A., Weeks, C.M., and Hauptman, H.A. Science, 259, 1430-1433, 1993参照)、SOLOMON (Collaborative Computational Project Number 4, Acta Crystallogr., D50, 760-763, 1994参照)、O (Jones, T.A., Zou, J.Y., Cowan, S.W., and Kjeldgaard, Acta Crystallogr., A47, 110-119, 1991参照)、及びCNS (Brunger, A.T. et al., Acta Crystallogr., D54, 905-921, 1998参照)のプログラムを用いて行った。これらの結果を表2及び表3に示した。表2からは、実施例3においてセレノメチオニン標識を行ったRasタンパク質の結晶(SeMet-Ras(CF))が、大腸菌生細胞で未標識合成し結晶化したもの(Ras (in vivo))及び無細胞タンパク質合成系でセレノメチオニン標識を行わずに合成し結晶化したもの(Ras (CF))と同一の空間群や格子定数等を示し、同一の立体構造を有することが分かる。表3には、MAD法により測定した4つの波長における位相データを示した。

## 【 0 0 4 8 】

【表2】 タンパク質合成方法によるX線結晶解析データの比較

	Ras (in vivo)	Ras (CF)	SeMet-Ras (CF)
空間群(space group)	P6522	P6522	P6522
格子定数A=B	83	83	83
格子定数C	103	103	103
R-sym	0	0	0
(2.02-2.00)	0	0	0
完全性(Completeness(%))	1	1	1
(2.02-2.00)	1	1	1
多重度(multiplicity(a/b))	15	16	19
独立反射数(unique reflections(a))	14692	14678	14558
observed reflection	219513	232493	271633
1/σ	9	9	17

## 【 0 0 4 9 】

【表 3】MAD法によるX線結晶解析データ

波長 ( $\lambda$ (Å))	0.979251 (edge)	0.978815 (peak)	0.971148 (remote1)	0.986604 (remote2)
分解能範囲 (Resolution range (Å))	20-2	20-2	20-2	20-2
測定反射数 (Measurements)	274641	219328	276044	271022
独立反射数 (Unique reflections)	14539	14566	14547	14539
完全性 (Completeness (%))	99.6 (99.8)	99.5 (98.5)	99.6 (100)	99.2 (84.7)
$\langle I \rangle / \langle \sigma(I) \rangle$	19.6	19.6	19	19.3
R <sub>sym</sub> (I) (%)	5.6 (15.1)	5.7 (14.8)	6.1 (16.7)	5.3 (14.2)
位相統計値 (Phasing statistics) (20-2 Å)				
Mean figure of merit		0.7181		
R <sub>cullis</sub> (dispersive)	-	0.63	0.56	0.67
R <sub>cullis</sub> (anomalous)	0.7	0.62	0.58	0.95
位相決定力 (Phasing power)	-	1.92	2.24	1.77
Refinement statistics				
R <sub>cryst</sub> (R <sub>free</sub> ) (%)	23.8 (28.3)			
rmsd bond length (Å)	0.00641			
rmsd bond angles (°)	1.11043			
rmsd impropers (°)	0.70115			

## 【0050】

このようにして解析したセレノメチオニンRasタンパク質の立体構造モデル(Ras-GDP(Cell-free))を、deVosらによってすでに報告されているモデル(Ras-GDP(in vivo))と比較して図5に示した。この図から、両者の立体構造がほぼ同じであることが分かる。

## 【0051】

## 【発明の効果】

本発明の方法を用いることにより、従来の生細胞を用いたタンパク質合成方法と比較して、重原子を含むタンパク質を極めて容易に且つ大量に製造することができる。製造されたタンパク質はX線結晶解析に適した重原子置換結晶の作成に好適に使用され、MAD法により効率的な立体構造の決定が可能となる。

## 【0052】

このような有用な方法の開発により、構造ゲノム科学研究において、ハイスループットな構造解析法が確立され、タンパク質の構造から機能を明らかにして新規な医薬品の開発等生命科学分野への貢献が期待される。

## 【図面の簡単な説明】

## 【図1】

無細胞タンパク質合成系において透析内液及び外液に添加したセレノメチオニ

ン濃度とタンパク質の合成量との関係を示す図である。

【図 2】

無細胞タンパク質合成系で合成したRasタンパク質の質量分析法による分析結果である。(a)はセレノメチオニンを導入したRasタンパク質。(b)はセレノメチオニンを含まないRasタンパク質である。

【図 3】

各種条件下で結晶化したRasタンパク質の結晶の写真である。

【図 4】

セレノメチオニンを含むRasタンパク質結晶のX線吸収微細構造(XAFS)の測定結果である。

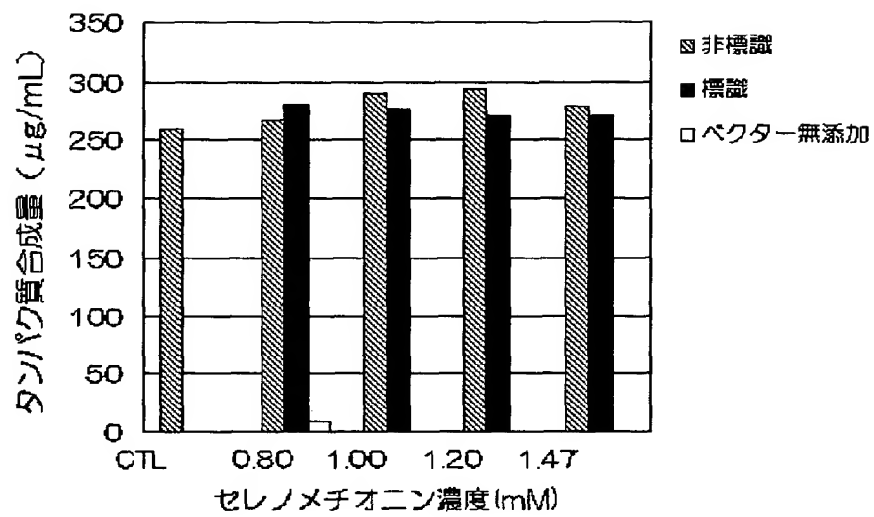
【図 5】

Rasタンパク質の立体構造をコンピュータグラフィックスにより表示したものである。

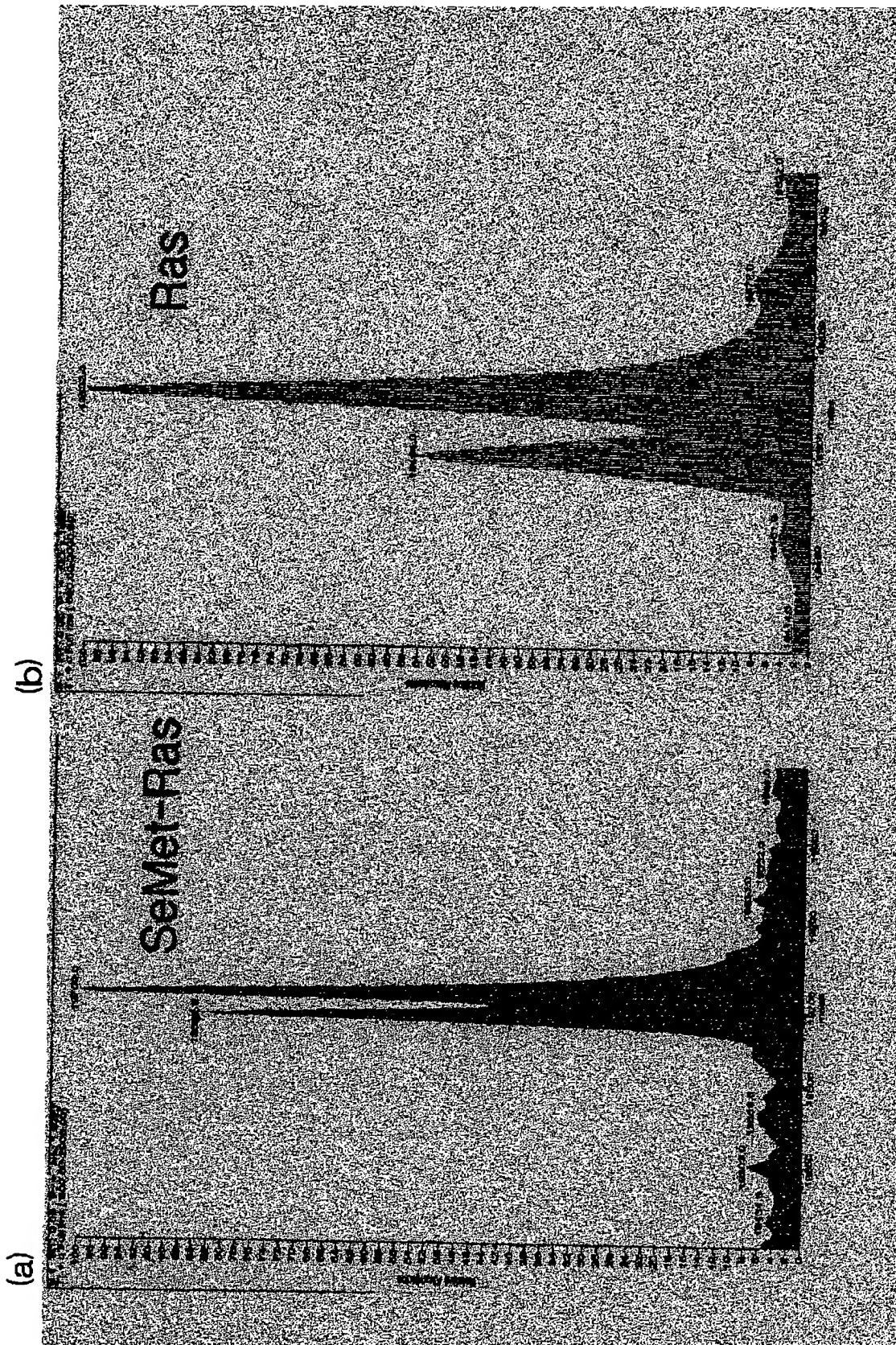
【書類名】

図面

【図 1】



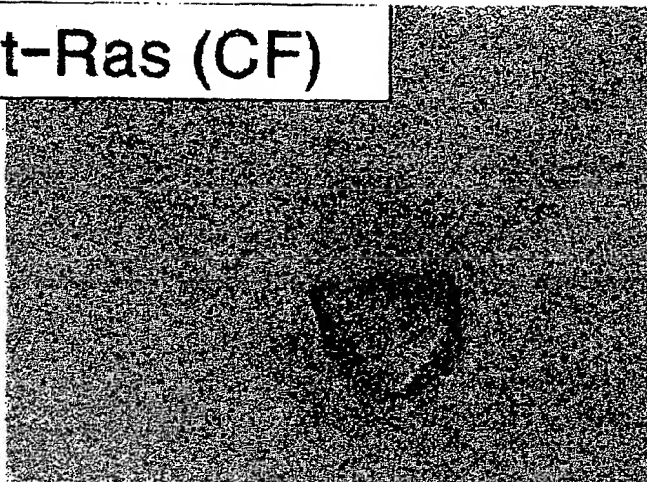
【図 2】



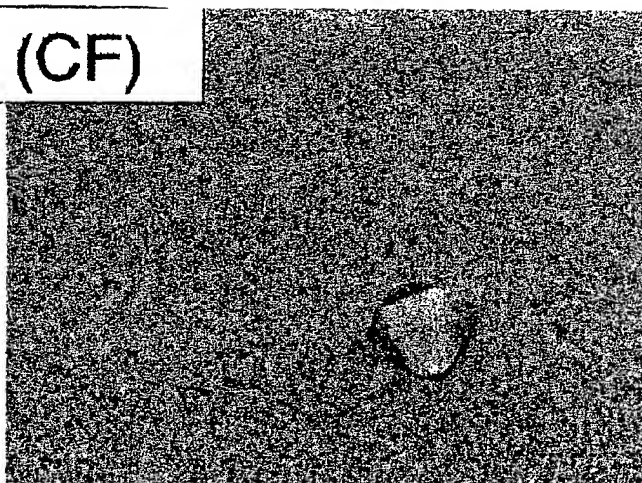


【図 3】

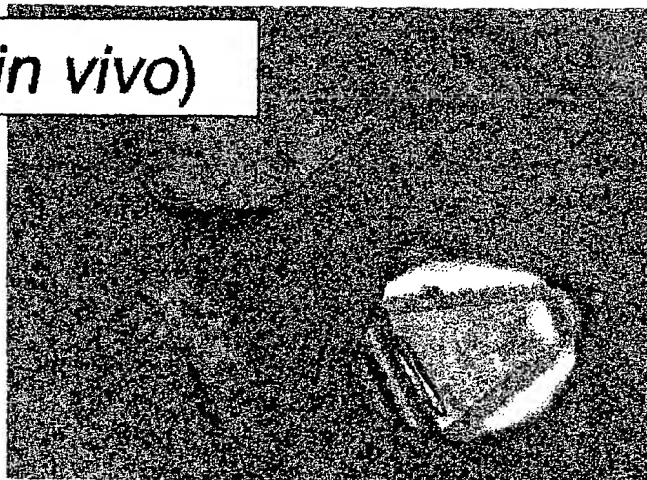
SeMet-Ras (CF)



Ras (CF)

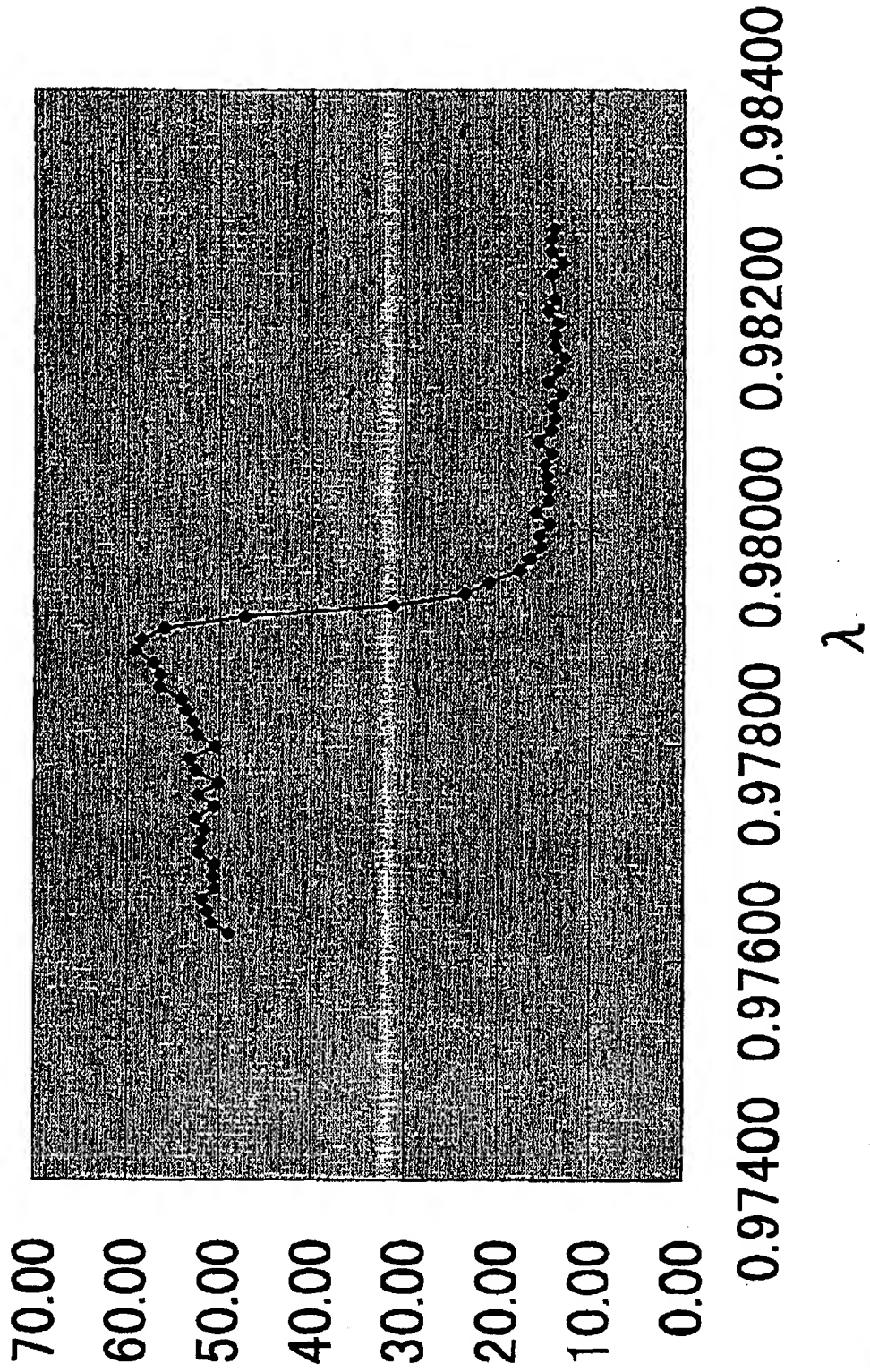


Ras (*in vivo*)



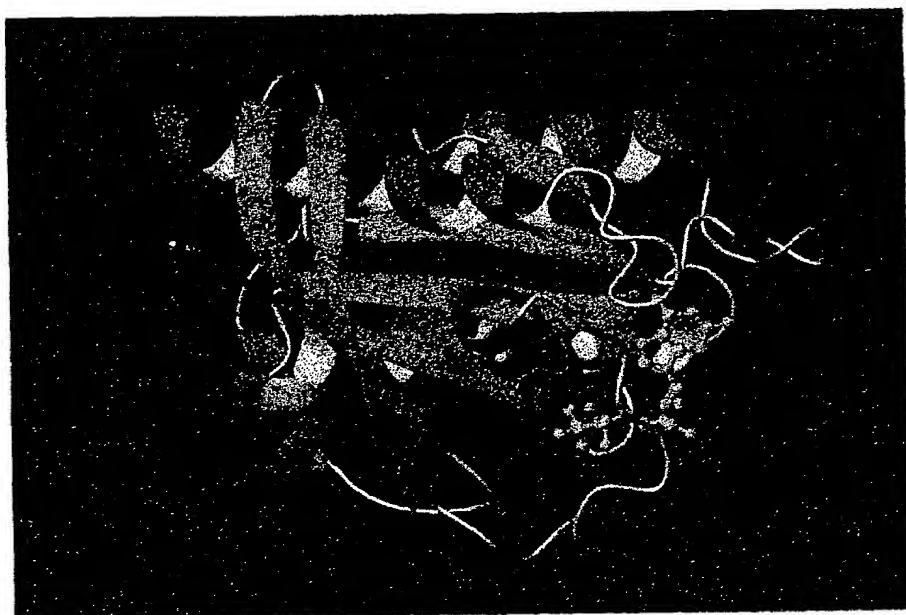
【図4】

$\lambda$  vs  $\ln(\text{ChA}/\text{ChB})$

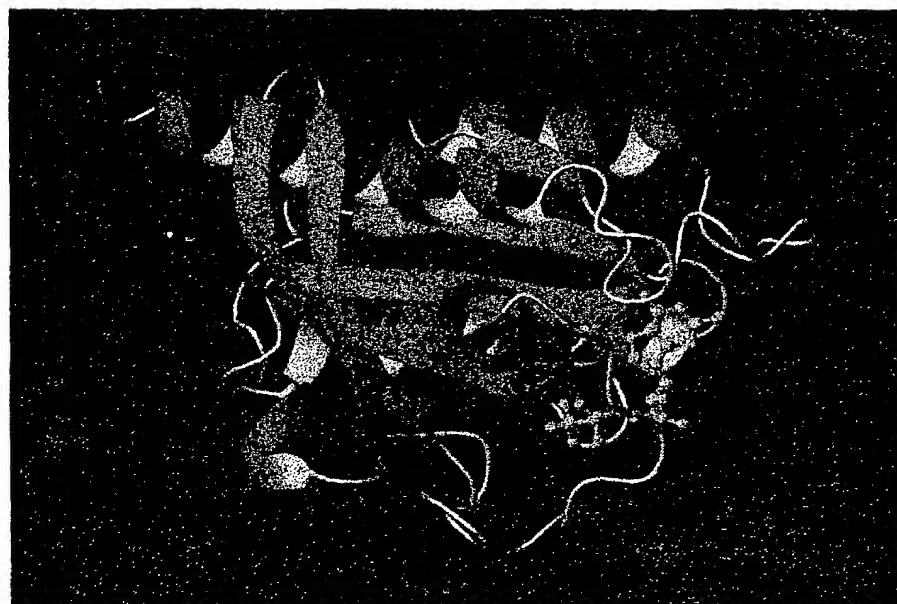


【図5】

Ras-GDP (Cell-free)



Ras-GDP (*in vivo*)



A. M. deVos *et al.*(1988)

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】

タンパク質のX線結晶構造解析、特にMAD法による位相決定に適した重原子置換体タンパク質の迅速且つ簡便な合成方法を提供する。

【解決手段】

細胞抽出液と、タンパク質をコードする核酸と、タンパク質合成基質としてのアミノ酸とを含む無細胞タンパク質合成系によるX線結晶解析に適したタンパク質の製造方法において、前記アミノ酸の少なくとも1種が重原子を含むアミノ酸であることに特徴を有する無細胞タンパク質合成系によりタンパク質を合成する。好ましい態様において、上記無細胞タンパク質合成系は、透析膜を介して透析内液と透析外液とから構成され、上記細胞抽出液と、上記タンパク質をコードする核酸とを透析内液に含み、タンパク質合成基質としてのアミノ酸を透析内液及び／又は透析外液に含む。この方法を用いることにより、生成するタンパク質への前記重原子を含むアミノ酸の導入率が極めて高く、生細胞を用いたタンパク質合成方法と比較して、重原子を含むタンパク質を極めて容易に且つ大量に製造することができる。

【選択図】

図1

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [ 0 0 0 0 0 6 7 9 2 ]

1. 変更年月日	1 9 9 0 年 8 月 2 8 日
[ 変更理由 ]	新規登録
住 所	埼玉県和光市広沢 2 番 1 号
氏 名	理化学研究所